

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-325271

(43) 公開日 平成8年(1996)12月10日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 F 5/02

7457-4H

C 0 7 F 5/02

C

// A 6 1 K 31/69

A D U

A 6 1 K 31/69

A D U

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号

特願平7-133015

(22) 出願日

平成7年(1995)5月31日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年3月13日
 社団法人日本化学会発行の「日本化学会第69春季年会
 1995年講演予稿集▲ I I ▼」に発表

(71) 出願人 591153178

日本アルキルアルミ株式会社

東京都港区虎ノ門4丁目1番21号

(72) 発明者 根本 尚夫

愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38 岡崎国

立共同研究機構分子化学研究所内

(72) 発明者 岩本 聡

宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 東北大学

理学部内

(72) 発明者 蔡 建平

愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38 岡崎国

立共同研究機構分子化学研究所内

(74) 代理人 弁理士 若林 忠

最終頁に続く

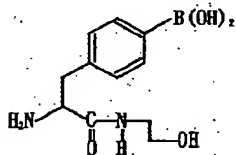
(54) 【発明の名称】 p-ボロノフェニルアラニン誘導体、その製造方法及び該誘導体の中間体化合物

(57) 【要約】

法に有用な化合物である。

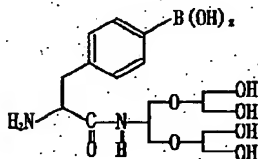
【構成】 下記式(1)または(5)で示される新規p-ボロノフェニルアラニン誘導体。

【化1】



(1)

【化2】



(5)

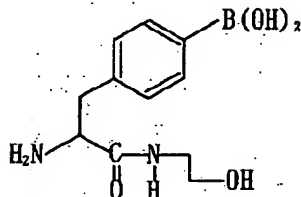
【効果】 これらの新規化合物は、p-ボロノフェニルアラニンよりもはるかに高い水溶性値を示し、また癌細胞に対して高い選択性を有することから、中性子捕捉療

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式 (1)

【化1】

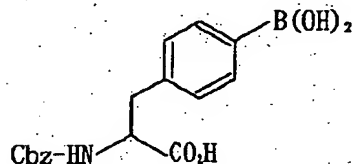


(1)

で表わされる p-ボロノフェニルアラニン誘導体。

【請求項2】 p-ボロノフェニルアラニンのアミノ基をカルボベンジルオキシ基で保護した下記式 (2)

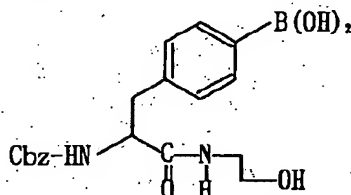
【化2】



(2)

(式中、Cbz はカルボベンジルオキシ基を表わす。) にN-メチルジエタノールアミンを作用させてホウ素部分を保護し、さらにエタノールアミンを反応させ、下記式 (4)

【化3】

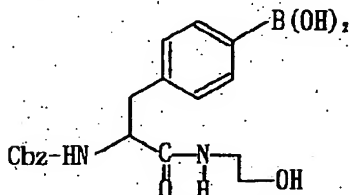


(4)

(式中、Cbz はカルボベンジルオキシ基を表わす。) を得、得られた式 (4) の化合物を脱カルボベンジルオキシ化することを特徴とする請求項1の式 (1) で表される p-ボロノフェニルアラニン誘導体の製造方法。

【請求項3】 下記式 (4)

【化4】



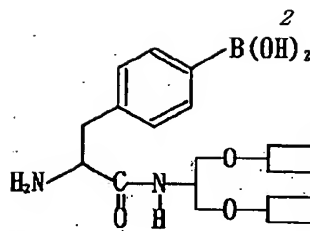
(4)

(式中、Cbz はカルボベンジルオキシ基を表わす。) で表わされる化合物。

【請求項4】 下記式 (5)

【化5】

(2)

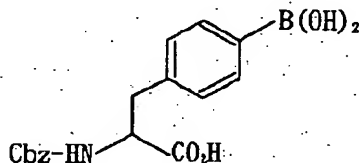


(5)

で表わされる p-ボロノフェニルアラニン誘導体。

【請求項5】 p-ボロノフェニルアラニンのアミノ基をカルボベンジルオキシ基で保護した下記式 (2)

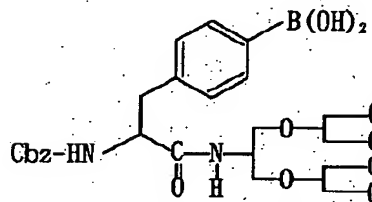
【化6】



(2)

(式中、Cbz はカルボベンジルオキシ基を表わす。) にN-メチルジエタノールアミンを作用させてホウ素部分を保護し、さらに2-アミノ-1, 3-ビス (1, 3-ジベンジル-2-グリセロキシ) プロパンを反応させ、下記式 (7)

【化7】

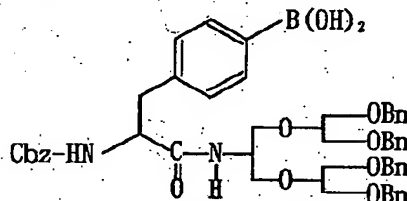


(7)

(式中、Cbz はカルボベンジルオキシ基を、Bn はベンジル基を表わす。) を得、得られた式 (7) の化合物を脱ベンジル化することによる請求項4の式 (5) で表される p-ボロノフェニルアラニン誘導体の製造方法。

【請求項6】 下記式 (7)

【化8】



(7)

(式中、Cbz はカルボベンジルオキシ基を、Bn はベンジル基を表わす。) で表わされる化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、黒色皮膚癌治療に用いられている p-ボロノフェニルアラニン (以下、BPA と略す) の水溶性を改善した新規 BPA 誘導体、その製造方法及び該誘導体の中間体化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、中性子捕捉療法による癌治療を目

(3)

的として、有機ホウ素化学が新しい形で展開されている。中性子捕捉療法(NCT)は、ホウ素10同位体を選択的に癌細胞に取り込ませ、低エネルギー中性子を照射して、細胞内で起こる核反応により癌を致死させるものである。

【0003】このような目的に使用される有機ホウ素化合物として、特に黒色皮膚がん治療のためにBPAが臨床レベルで使用されている(Y. Mori, A. Suzuki, K. Yoshino, and H. Kakiha, *Pigment Cell Res.*, 2, 273 (1989))。BPAはメラニンの生成のために細胞中に強く取り込まれるフェニルアラニンあるいはチロシン類の一種である。しかしながら、BPAは水への溶解性が低く、そのため、通常はその塩酸塩あるいはアルカリ金属塩として用いられている。また最近では、BPAの単糖類錯体が水溶性改善のために用いられている。しかしながら、BPAと単糖類との間の不安定な化学的相互作用のため、細胞内においてBPA自体は錯体から容易に解離してしまう。現在、前述の用途に用いる水溶性のBPA類似体の開発が所望されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、先に特願平5-221048号に、水溶性の改善されたBPA類似体を提案している。ここに提案されているBPA類似体は、従来のBPA類似体に代わり得る水溶性の改善された新規のBPA類似体である。本発明の目的は前記BPA類似体と同等あるいはそれ以上の水溶性の改善された新規なBPA誘導体を提供することにある。

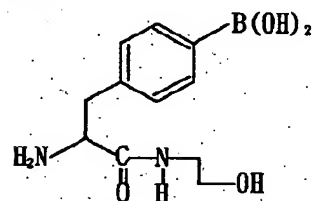
* 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を課題を解決するべく鋭意検討した結果、下記の新規化合物を得、本発明に到達した。

【0006】即ち、本発明は下記式(1)または(5)

【0007】

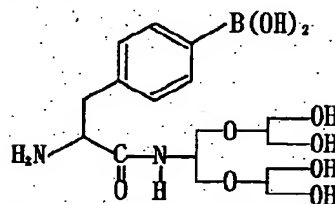
【化9】



(1)

【0008】

【化10】



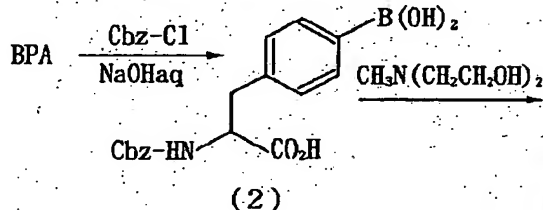
(5)

で表わされる新規のBPA誘導体を提供するものである。

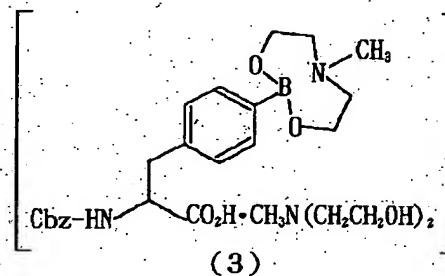
【0009】式(1)のBPA誘導体は以下の反応スキームに従って合成される。

【0010】

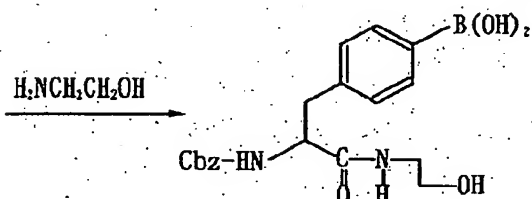
【化11】



(2)



(3)



(4)

【0011】即ち、原料の(±)-BPAのアミノ基をカルボベンジルオキシ(Cbz)基で保護し、式(2)の化合物を得る。次に、化合物(2)のホウ素部分をN-メチルジエタノールアミンによって保護した式(3)を得、in situでエタノールアミンと反応させることに

より目的とする式(4)の化合物を得る。化合物(4)から化合物(1)への変換は、化合物(4)のカルボベンジルオキシ部を水酸化パラジウムの存在下で処理して、一旦化合物(1)の塩酸塩とし、これをイオン交換樹脂及び高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を用い

BEST AVAILABLE COPY

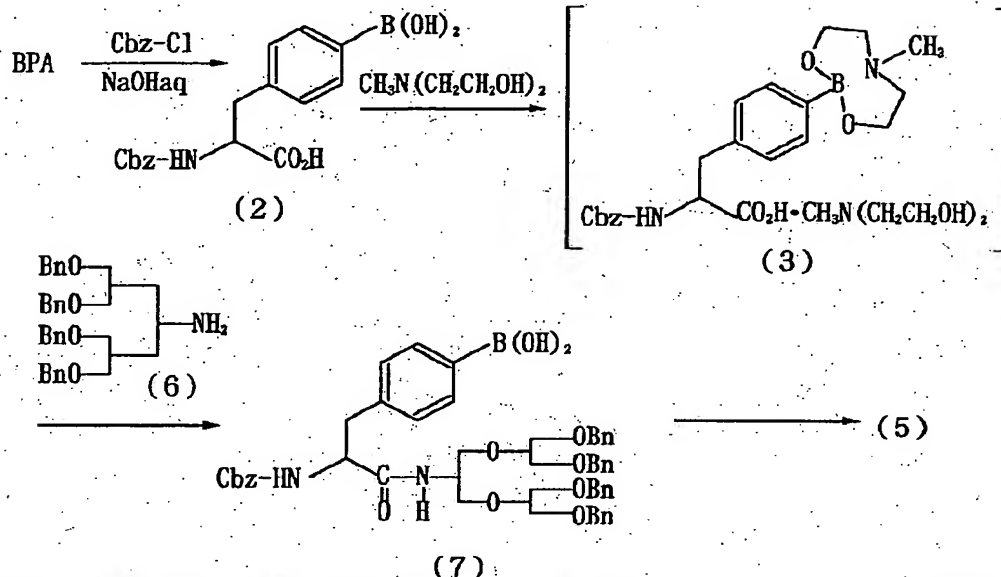
(4)

5

て精製することにより、化合物 (1) が得られる。

【0012】式 (5) のBPA誘導体は以下の反応スキームに従って合成される。

* 【0013】
【化12】



(7)

【0014】即ち、前記同様にして得られた化合物 (2) のホウ素部分をN-メチルジエタノールアミンによって保護した式 (3) を得、in situで2-アミノ-1, 3-ビス (1, 3-ジベンジル-2-グリセロキシ) プロパン (式 (6))、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) 及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミジプロピル) カルボジイミド (EDC) と反応させることにより目的とする式 (7) の化合物を得る。

化合物 (7) から化合物 (5) への変換は、化合物 (7) のベンジル部を水酸化パラジウムの存在下で処理して脱ベンジル化し、一旦化合物 (5) の塩酸塩とし、これをイオン交換樹脂及び高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いて精製することにより、化合物 (5) が得られる。

【0015】本発明において、原料として用いられるBPAは、H. R. SnyderらによるJ. Am. Chem. Soc., 80, 835 (1958) に記載された方法により合成することができる。

【0016】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。

【0017】実施例1

N-メチルジエタノールアミン (1.9 ml, 16.5 mmol) 及び式 (2) の化合物 (2.561 g, 7.46 mmol) の混合物をDMF溶液 (10 ml) 中、室温で10分間撹拌した。この混合物中にエタノールアミン (0.50 g, 8.28 mmol)、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (1.701 g, 11.11 mmol) 及びEDC (1.782 g, 9.30 mmol) を添加し、室温で20時間撹拌した。反応終了後、

混合物を3N-HCl (75 ml) 溶液中に排出し、生成物を酢酸エチルで3回抽出した。合わせた有機相を塩水で洗浄した後、 Mg SO_4 で乾燥し、溶媒を真空濃縮した。得られた粗生成物をクロロホルム/メタノール (50/1) を展開液として用いた短シリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製し、目的物 (4) を白色固体として得た。

【0018】実施例2

実施例1で得られた化合物 (4) をエタノール100 ml 及びHCl水溶液 (12N, 0.34 ml, 4.08 mmol) 中に溶解した溶液を懸濁させたPd (OH) 2-C (2.50 g) の存在下に水素気流下、1時間、室温で撹拌した。反応終了後、定法により目的物を得た。得られた粗生成物をHPLC (「Shim-pack」(商品名、島津製作所製)、PREP-ODS、20.0 mm × 25 cm, 5 ml/min、メタノール/水=1/9で展開) で精製し、目的物 (1) 1.08 g (2.09 mmol) を白色固体として得た。収率は28%であった。

【0019】得られた化合物はIR、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及び元素分析により式 (1) の構造であることが確認された。以下に、IR、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及び元素分析のデータを示す。

【0020】IR (KBr): 3355, 2400, 1650, 1560, 1430, 1385, 1350, 1055, 670 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ 7.62 (d, $J=7.4\text{ Hz}$, 2H, -B-C (CHCH)₂-C-), 7.18 (d, $J=7.4\text{ Hz}$, 2H, -B-C (CHCH)₂-C-), 3.65 (dd, $J=7.2, 6.9\text{ Hz}$, 1

(5)

^1H , $\text{D}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COND}-$, 3.45 (dt, $J=11.5, 5.9\text{Hz}$; 1H, $-\text{COND}-\text{CH}_2-$), 3.37 (dt, $J=11.5, 5.9\text{Hz}$; 1H, $-\text{COND}-\text{CH}_2-$), 3.15 (t, $J=5.9\text{Hz}$; 2H, $-\text{CH}_2-\text{OD}$), 2.93 (dd, $J=13.8, 6.9\text{Hz}$; 1H, $-\text{BC}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$), 2.87 (dd, $J=13.8, 7.2\text{Hz}$; 1H, $-\text{BC}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$)
 ^{13}C -NMR (D_2O): δ 175.4, 138.5, 133.5, 128.7, 59.7, 55.9, 41.0, 40.0

元素分析 ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}_2 \cdot 10\text{B}(\text{H}_2\text{O})_{0.29}$)

| | C% | H% | N% |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 54.84 | 6.47 | 10.66 |
| 測定値 | 54.83 | 6.63 | 10.65 |

【0021】合成例1

(2-アミノ-1, 3-ビス (1, 3-ジベンジル-2-グリセロキシ) プロパン (6) の合成)

10.267 g (17.09 mmol) の1, 3-ビス (1, 3-ジベンジル-2-グリセロキシ) -2-プロパノールと4.896 g (25.68 mmol) のp-トシルクロリドをピリジン6.5 ml 中で混合し、該混合液を0.428 g (3.50 mmol) のジメチルアミノピリジンの存在下室温で17時間攪拌した。反応終了後、40 ml の3N-HCl 溶液を0℃で加え、エーテルで3回抽出した。抽出した有機相を合わせて飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び塩水で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥後、減圧濃縮した。このようにして得られたトシル化物を精製せずにアジ化ナトリウム (3.379 g, 51.98 mmol) とDMF (20 ml) 中で120℃5時間攪拌した。反応混合液を室温に冷却後、水を加え反応を停止させ、エーテルで3回抽出した。抽出した有機相を合わせて飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び塩水で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥後、減圧濃縮してアジ化物を得た。次に得られたアジ化物の50 ml エーテル溶液にリチウムアルミニウムヒドライド (1.00 g, 26.35 mmol) のエーテル (20 ml) 溶液を0℃で滴下し、この混合物を0℃で3時間攪拌した。反応を酢酸エチル/水を加えて止め、得られた懸濁を濾過した。濾液を MgSO_4 で乾燥後、減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル/エタノール (100/1) を展開液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製し、目的物を無色油状物として得た (7.457 g, 12.43 mmol, 収率73%)。以下に、IR、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR及び元素分析のデータを示す。

【0022】IR (neat): 3380, 3030, 2860, 2360, 1910, 1870, 1810, 1585, 1495, 1455, 1410, 1365, 1310, 1250, 1205, 1100, 735, 700, 610 cm^{-1}

8

^1H -NMR (CDCl_3): δ 7.21-7.35 (m, 20H, 芳香族), 4.50 (s, 8H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{O}-$), 3.43-3.74 (m, 14H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ 及び $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}-$), 3.14 (tt, $J=6.7, 4.9\text{Hz}$; 1H, $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}-$), 1.90 (br s, 2H, $\text{H}_2\text{N}-$)
 ^{13}C -NMR (CDCl_3): δ 138.1 (芳香族), 128.3 (芳香族), 127.7 (芳香族), 127.5 (芳香族), 78.4 ($-\text{HC}-\text{O}-$), 73.2 (ベンジル基), 72.6 (メチレン基), 51.3 ($\text{H}_2\text{N}-\text{C}-$)

元素分析 ($\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{O}_6\text{N}$)

| | C% | H% | N% |
|-----|-------|------|------|
| 計算値 | 74.10 | 7.56 | 2.34 |
| 測定値 | 74.18 | 7.38 | 2.34 |

【0023】実施例3

N-メチルジエタノールアミン (2.1 ml, 18.29 mmol) 及び式 (2) の化合物 (2.852 g, 8.31 mmol) の混合物をDMF溶液 (10 ml) 中、室温で10分間攪拌した。この混合物中に合成例1で得られた化合物 (5.460 g, 9.10 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (1.913 g, 12.49 mmol) 及びEDC (1.995 g, 10.40 mmol) を添加し、室温で20時間攪拌した。反応終了後、混合物を3N-HCl (100 ml) 溶液中に排出し、生成物を酢酸エチルで3回抽出した。合わせた有機相を塩水で洗浄した後、 MgSO_4 で乾燥し、溶媒を減圧濃縮した。得られた粗生成物をクロロホルム/メタノール (30/1) を展開液として用いた短シリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製し、目的物 (7) を得た。

【0024】実施例4

実施例3で得られた化合物 (7) をエタノール40 ml 及びHCl 水溶液 (12N, 2 ml) 中に溶解した溶液を懸濁させたPd (OH) $_2$ -C (2.50 g) の存在下に水素雰囲気下、室温で37時間攪拌した。反応終了後、定法により目的物を得た。得られた粗生成物をHPLC (「Shim-pack」 (商品名、島津製作所製)、PREP-ODS, 20.0 mm \times 2.5 cm, 5 ml/min、メタノール/水=1/9で展開) で精製し、目的物 (5) 1.321 g (3.068 mmol) を白色固体として得た。収率は37%であった。

【0025】得られた化合物はIR、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR及び元素分析により式 (5) の構造であることが確認された。以下に、IR、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR及び元素分析のデータを示す。

【0026】IR (KBr): 3360, 2875, 2360, 1655, 1560, 1480, 1435, 1350, 1110, 1075, 820, 665 cm^{-1}

^1H -NMR (D_2O): δ 7.65 (d, $J=7.4\text{Hz}$)

9

z, 2H, -B-C (CHCH) ₂C-), 7. 20 (d, J=7. 4 Hz, 2H, -B-C (CHCH) ₂C-), 3. 95 (m, 1H, ND-CH-), 3. 73-3. 69 (m, 15H, D₂N-CH-COND-, -CH₂-O-×1, -CH₂-O-×5, -CH-O-×3), 3. 11 (dd, J=10. 1, 5. 9 Hz, 1H, -CH₂-O-), 2. 90 (d, J=13. 2, 5. 6 Hz, 1H, -BC₆H₄-CH₂-), 2. 82 (d, J=13. 2, 9. 0 Hz, 1H, -BC₆H₄-CH₂-)
¹³C-NMR (CDCl₃): δ 175. 6, 138. 8, 133. 7, 128. 8, 127. 0, 80. 9, 68. 6, 67. 8, 60. 5, 60. 4, 60. 2, 56. 0, 49. 0, 40. 1

元素分析 (C₁₂H₁₁O₅N₂ · 1/2 B (H₂O) · 1. 00)

| | C% | H% | N% |
|-----|-------|------|------|
| 計算値 | 52.55 | 7.10 | 6.81 |
| 測定値 | 52.85 | 6.93 | 6.82 |

【0027】得られた化合物(1)(BPA(OH))及び(5)(BPA(OH)₄)の室温における水溶性、細胞毒性(細胞の残存率)、細胞取り込みを、BPA、特願平5-221048で提案したBPA(OH)₂と比較した。

【0028】水溶性

ほう素化合物の十分量を純水に加え、混合物を20℃で12時間攪拌し、各ほう素化合物の飽和溶液を得た。不溶のほう素化合物はメンブランフィルターにより濾過し、各飽和溶液のほう素原子の濃度をICP-AESを用いて求めた。各試験を3回繰り返して行った。値は平均±S.E.として示される。結果を表1に示す。

【0029】

【表1】

| BPA誘導体 | 水溶性値 (M、室温) |
|----------------------|----------------------------|
| BPA | 7. 7±0. 1×10 ⁻³ |
| BPA(OH) | 6. 0±0. 1×10 ⁻¹ |
| BPA(OH) ₂ | 6. 6±0. 1×10 ⁻¹ |
| BPA(OH) ₄ | 1. 2±0. 05 |

【0030】細胞毒性(細胞の残存率)

各BPA誘導体のB-16メラノーマ細胞(B-16)及びTIG-1-20Fibroblast細胞(ヒト胎児肺正常細胞、TIG)に対する細胞毒性を表2に示す。細胞培養液にEagle-MEM(10%胎牛血清)を用い、各ほう素化合物(70μmol)を7mlの培養液に溶解し、得られた混合物をメンブランフィルターを通して

(6)

10

濾過し、滅菌した。濾液(3ml)と細胞の懸濁培養液(1×10⁵細胞/ml, 1ml)をFalcon 3002培養皿(直径60mm)中に加え、ほう素化合物の濃度が1. 5×10⁻²Mとなるように同媒体で希釈した。5%二酸化炭素雰囲気下、37℃で懸濁を3日間培養した。懸濁の上澄みを除去し、残っている細胞をトリプシンで処理し、生存細胞の数を計測した。観察された値を、ほう素化合物を加えなかった標準系の数で除した。この操作を3回繰り返した。値は平均±S.E.として示される。結果を表2に示す。

【0031】

【表2】

| BPA誘導体 | 残存率 (%) | |
|----------------------|---------|-------|
| | B-16 | TIG |
| なし | 100±3 | 100±3 |
| BPA | 20±1 | 20±1 |
| BPA(OH) | 60±2 | 66±2 |
| BPA(OH) ₂ | 60±2 | 71±2 |
| BPA(OH) ₄ | 62±2 | 73±2 |

【0032】細胞取り込み性

次に、各ほう素化合物の細胞への浸透性を、ICP-AES法を用いて行なった。B-16細胞をFalcon 3025皿(直径150mm)で培養し、80%飽和状態に細胞が成長した時の細胞数を数えた(5. 0×10⁶細胞/皿)。一皿は対照試験(ほう素化合物フリー)のために用いた。これらの皿に各BPA誘導体の2mMを加え、37℃、5%二酸化炭素存在下で3、12、24時間細胞を培養した。懸濁の上澄みを除去後、残留細胞を3回Ca-Mgフリーの磷酸緩衝溶液[PBS(-)]で洗浄し、ゴム性ポリスマンでかき集めて、60%HClO₄水溶液/30%H₂O₂溶液7mlで溶解し、70℃で1時間分解した。メンブランフィルター(ミリポア(Millipore), 0. 22μm)で濾過した後、ほう素濃度をICP-AES(島津製作所製、ICP-1000-III)で確定した。対照試験のほう素濃度を各皿の細胞のほう素濃度から差し引いた。TIG-1-20細胞の場合も同様の手順を用いた。各試験は3回繰り返して、値は平均±S.E.として示される。なお、BPA自身についてはその溶解性が低いため、BPA-HClを用い、濃度を2mMに調整した。結果を図1に示す。

【0033】図1から分かるように、ほう素取り込み性

(7)

11

は、細胞及びほう素誘導体の種類に関係なく、時間の経過と共に増加している。B-16メラノーマ細胞によるBPA(OH)_nの細胞取り込みはいずれの時間においてもTIG正常細胞よりも大きい。この観察は、B-16が癌細胞でありTIGが正常細胞の一種であること、B-16の成長がTIGよりも速いことの事実を反映しているように思われる。

【0034】24時間における細胞取り込みを図2に示す。BPA(OH)_nの水溶性の増加に伴い、ほう素取り込み性はB-16メラノーマとTIG胎児肺細胞に関わりなく減少している。図2からは細胞取り込み性の選択性があることが観察され、明らかに、B-16細胞のTIG細胞に対するほう素取り込み比はBPAの場合よりもBPA(OH)₄の場合のほうが大きくなっている。

【0035】図3はBPA(OH)_nの水溶性とB-16細胞のTIG細胞に対するほう素取り込み比の間の関係を示している。これは癌細胞による選択取り込みが水溶性の増加に伴って強められていることが有効な結果である。

【0036】24時間での細胞取り込み(BPA(OH)_nの細胞内モル濃度)と細胞残存率の直接対比を図

12

4(B-16に対して)及び図5(TIGに対して)に示す。細胞取り込みは親水性の増加に基づいて減少していることから、化合物の親水性の増加と細胞毒性の低下との間に相関関係があると考えられる。

【0037】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の式(1)及び(5)で表わされる新規BPA誘導体は、BPAよりもはるかに高い水溶性値を示し、また癌細胞に対して高い選択性を有することから、中性子捕捉療法に有用な化合物である。

【図面の簡単な説明】

【図1】各ほう素化合物のB-16及びTIG細胞への培養時間に対する浸透性を示すグラフである。

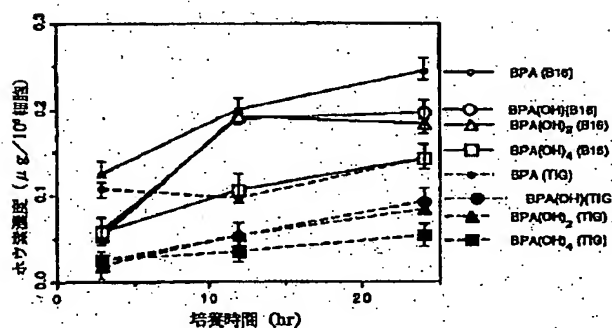
【図2】図1における24時間での細胞取り込み性を示す図である。

【図3】BPA(OH)_nの水溶性とB-16細胞のTIG細胞に対するほう素取り込み比の間の関係を示すグラフである。

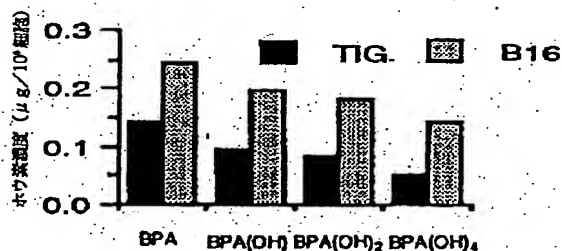
【図4】B-16細胞の残存率と細胞内のほう素濃度との関係を示すグラフである。

【図5】TIG細胞の残存率と細胞内のほう素濃度との関係を示すグラフである。

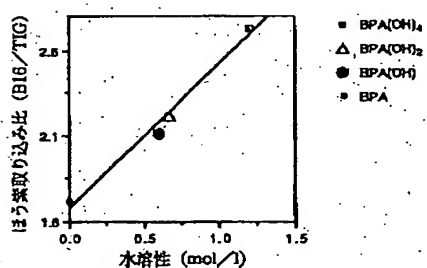
【図1】



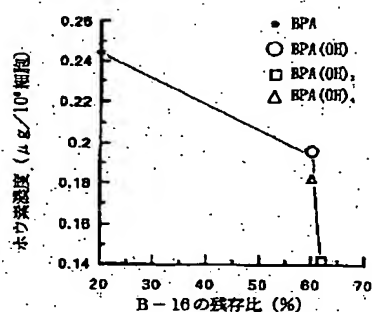
【図2】



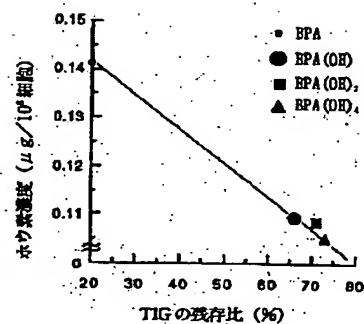
【図3】



【図4】



【図5】



(8)

フロントページの続き

(72)発明者 山本 嘉則
宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 東北大学
理学部内

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-325271

(43)Date of publication of application : 10.12.1996

(51)Int.Cl.

C07F 5/02
// A61K 31/69

(21)Application number : 07-133015

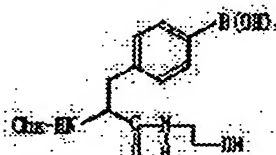
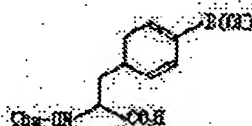
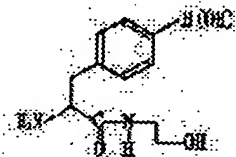
(71)Applicant : NIPPON ALKYL ALUM KK

(22)Date of filing : 31.05.1995

(72)Inventor : NEMOTO HISAO
IWAMOTO SATOSHI
SAI KENPEI
YAMAMOTO YOSHINORI**(54) P-BORONOPHENYLALANINE DERIVATIVE, ITS PRODUCTION AND INTERMEDIATE COMPOUND FOR THE DERIVATIVE****(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain a new p-boronophenylalanine derivative exhibiting a far higher water solubility value than that of p-boronophenylalanine used for the treatment of carcinoma cutaneum, having high selectivity against cancer cells, and useful for neutron-catching therapeutic method.

CONSTITUTION: The p-boronophenylalanine derivative of formula I. The derivative is obtained by treating a compound of formula II (Cbz is carbobenzyloxy), which is obtained by protecting the amino group of p-boronophenylalanine with a carbobenzyloxy group, with N-methyldiethanolamine to protect the boron part, reacting the product with ethanolamine, and subsequently subjecting the obtained compound of formula III to a carbobenzyloxy-removing reaction.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

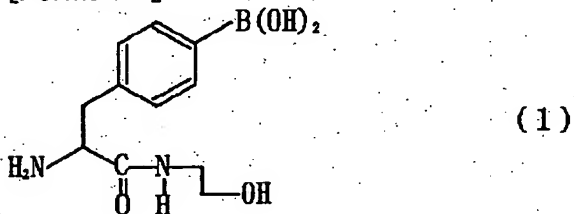
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The following type (1)

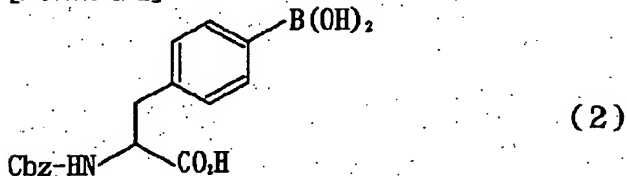
[Formula 1]



p-BORONO phenylalanine derivative come out of and expressed.

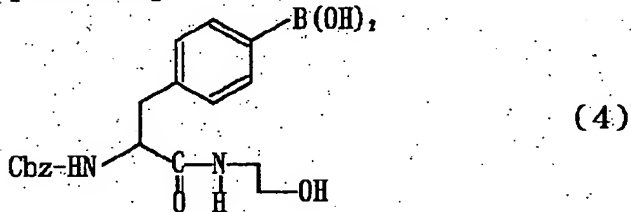
[Claim 2] The following formula which protected the amino group of p-BORONO phenylalanine by the KARUBO benzyloxy radical (2)

[Formula 2]



(— Cbz expresses a KARUBO benzyloxy radical among a formula.) — N-methyldiethanolamine is made to act, a boron part is protected and ethanolamine is reacted further — making — the following formula (4)

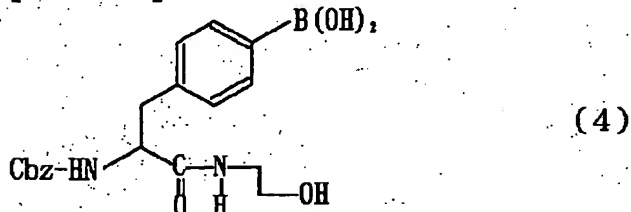
[Formula 3]



(— Cbz expresses a KARUBO benzyloxy radical among a formula.) — the manufacture approach of p-BORONO phenylalanine derivative expressed with the formula (1) of claim 1 characterized by obtaining and making the compound of the obtained formula (4) deKARUBO benzyloxy.

[Claim 3] The following type (4)

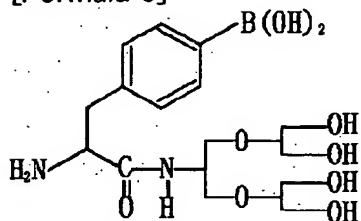
[Formula 4]



(— Cbz expresses a KARUBO benzyloxy radical among a formula.) — compound expressed.

[Claim 4] The following type (5)

[Formula 5]

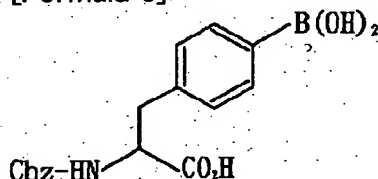


(5)

p-BORONO phenylalanine derivative come out of and expressed.

[Claim 5] The following formula which protected the amino group of p-BORONO phenylalanine by the KARUBO benzyloxy radical (2)

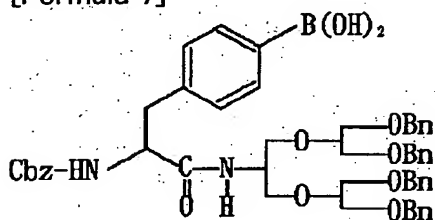
[Formula 6]



(2)

(— Cbz expresses a KARUBO benzyloxy radical among a formula.) — N-methyldiethanolamine is acted — making — a boron part — protecting — further — the 2-amino —1 and a 3-bis(1, 3-dibenzyl-2-GURISEROKISHI) propane are reacted — making — the following formula (7)

[Formula 7]

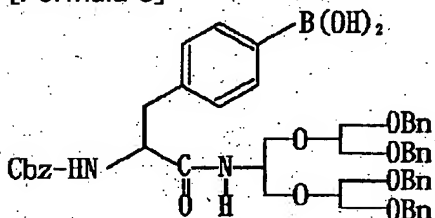


(7)

(— Cbz expresses a KARUBO benzyloxy radical among a formula, and Bn expresses benzyl.) — the manufacture approach of p-BORONO phenylalanine derivative expressed with the formula (5) of claim 4 by obtaining and debenzylating the compound of the obtained formula (7).

[Claim 6] The following type (7)

[Formula 8]



(7)

(— Cbz expresses a KARUBO benzyloxy radical among a formula, and Bn expresses benzyl.) — compound expressed.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.*** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the intermediate-field compound of the new BPA derivative which has improved the water solubility of p-BORONO phenylalanine (it abbreviates to BPA hereafter) used for the black skin carcinoma therapy, its manufacture approach, and this derivative.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, organic boron chemistry is developed in a new form for the purpose of the cancer treatment by neutron capture therapy. Neutron capture therapy (NCT) makes a cancer cell incorporate boron 10 isotope alternatively, irradiates a low energy neutron, and carries out fatality of the cancer by the nuclear reaction which occurs by intracellular.

[0003] As an organic boron compound used for such a purpose, BPA is especially used with the clinical level for the black carcinoma-cutaneum therapy (Y. Mori, A.Suzuki, KYoshino, and H.Kakihana, Pigment Cell Res., 2,273 (1989)). BPA is a kind of the phenylalanine incorporated strongly [in a cell] because of generation of melanin, or thyrosins. However, the solubility of BPA to water is low, therefore it is usually used as the hydrochloride or an alkali-metal salt. Moreover, recently, the monosaccharide complex of BPA is used for the water-soluble improvement. However, in intracellular, the BPA itself will be easily dissociated from a complex for the unstable chemical interaction between BPA and monosaccharide. It asks for development of current and the water-soluble BPA analog which can be used for the above-mentioned application.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The BPA analog proposed by ***** as which this invention persons have proposed the BPA analog by which water solubility has been improved by Japanese Patent Application No. No. 221048 [five to] previously is a new BPA analog by which the water solubility which can be replaced with the conventional BPA analog has been improved. The purpose of this invention is to offer the new BPA derivative with which the water solubility beyond said BPA analog and EQC, or it has been improved.

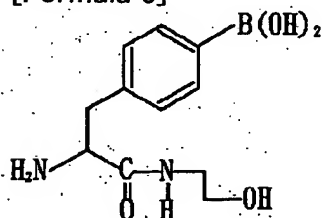
[0005]

[Means for Solving the Problem] As a result of examining the above-mentioned technical problem wholeheartedly in order to solve a technical problem, this invention persons got the following new molecular entity, and reached this invention.

[0006] namely, this invention — the following type (1) — or (5) —

[0007]

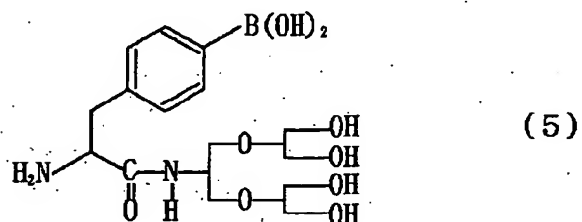
[Formula 9]



(1)

[0008]

[Formula 10]

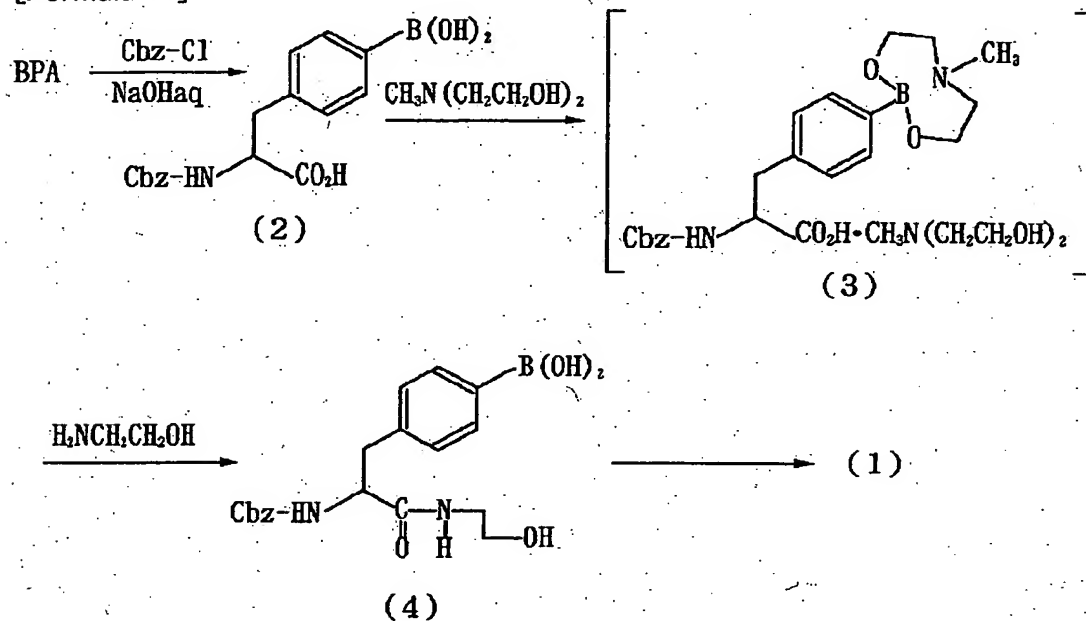


It comes out and the new BPA derivative expressed is offered.

[0009] The BPA derivative of a formula (1) is compounded according to the following reaction schemes.

[0010]

[Formula 11]

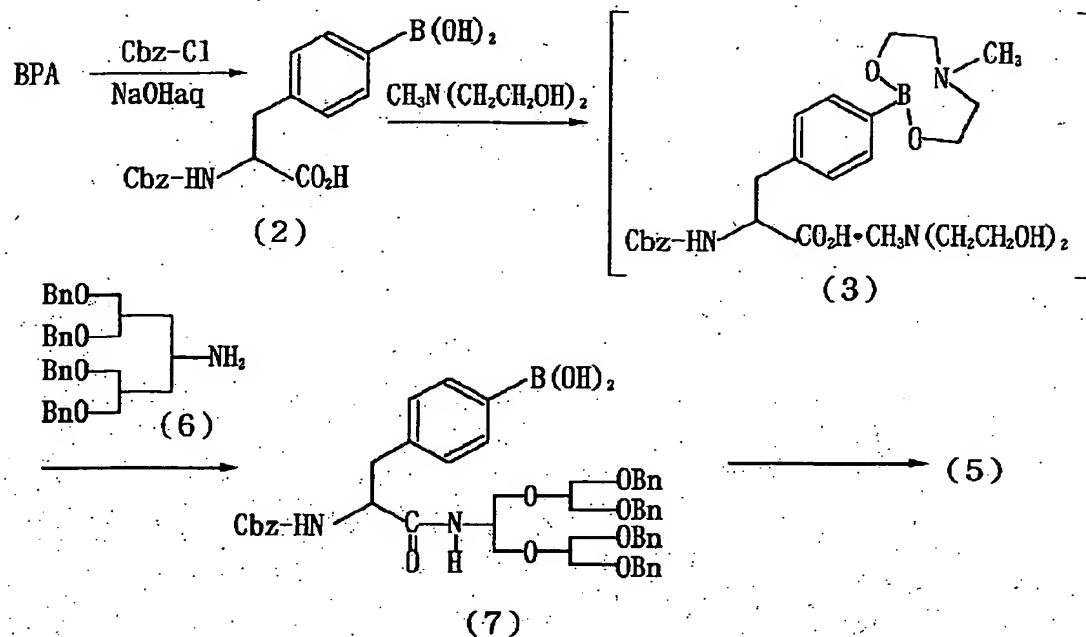


[0011] That is, the amino group of (**)BPA of a raw material is protected by the KARUBO benzyloxy (Cbz) radical, and the compound of a formula (2) is obtained. Next, the formula (3) which protected the boron part of a compound (2) by N-methyldiethanolamine is obtained, and the compound of the formula (4) made into the purpose is obtained by making it react with ethanolamine by in situ. A compound (1) is obtained by the conversion to a compound (1) from a compound (4) processing the KARUBO benzyloxy section of a compound (4) under existence of hydroxylation palladium, once making it into the hydrochloride of a compound (1), and refining this using ion exchange resin and high speed liquid chromatography (HPLC).

[0012] The BPA derivative of a formula (5) is compounded according to the following reaction schemes.

[0013]

[Formula 12]



[0014] Namely, the formula (3) which protected the boron part of said compound (2) obtained similarly by N-methyldiethanolamine is obtained. By in situ, the 2-amino -1, a 3-bis(1, 3-dibenzyl-2-GURISEROKISHI) propane (formula (6)), The compound of the formula (7) made into the purpose is obtained by making it react with 1-hydroxy benzotriazol (HOBt) and a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). A compound (5) is obtained by the conversion to a compound (5) from a compound (7) processing and debenzylating the benzyl section of a compound (7) under existence of hydroxylation palladium, once making it into the hydrochloride of a compound (5), and refining this using ion exchange resin and high speed liquid chromatography (HPLC).

[0015] In this invention, BPA used as a raw material is compoundable by J.Am.Chem.Soc. by H.R.Snyder and others, and the approach indicated by 80,835 (1958). [0016]

[Example] Hereafter, an example explains this invention concretely.

[0017] The mixture of the compound (2.561g, 7.46mmol) of 1N-methyldiethanolamine (1.9ml, 16.55mmol) of examples and a formula (2) was stirred for 10 minutes at the room temperature among the DMF solution (10ml). Ethanolamine (0.50g, 8.28mmol), N-hydroxy benzotriazol (1.701g, 11.11mmol), and EDC (1.782g, 9.30mmol) were added in this mixture, and it stirred at the room temperature for 20 hours. Mixture was discharged in 3 N-HCl (75ml) solution after reaction termination, and ethyl acetate extracted the product 3 times. After salt water washed the doubled organic phase, it dried by MgSO_4 and vacuum concentration of the solvent was carried out. The short silica gel column chromatography which used chloroform/methanol (50/1) as a developing solution refined the obtained rough product, and the specified substance (4) was obtained as a white solid-state.

[0018] It stirred at the room temperature under the hydrogen air current for 1 hour under existence of Pd (OH) $_2$ -C (2.50g) which made the solution which dissolved the compound (4) obtained in the example 2 example 1 into ethanol 100ml and a HCl water solution (12 Ns, 0.34ml, 4.08mmol) suspend. after reaction termination and a law — the specified substance was obtained by the method. The obtained rough product was refined by HPLC ("Shim-pack" (a trade name, Shimadzu make), PREP-ODS, 20.0mmx25cm, 5ml/min., a methanol/water = it develops by one ninth), and specified substance (1) 1.088g (2.09mmol) was obtained as a white solid-state. Yield was 28%.

[0019] As for the obtained compound, it was checked by IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, and elemental analysis that it is the structure of a formula (1). Below, the data of IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, and ultimate analysis are shown.

[0020] IR(KBr): 3355, 2400, 1650, 1560, 1430, 1385, 1350 and 1055, 670 cm^{-1} ^1H -NMR(D_2O): δ 7.62 (d, J= 7.4Hz, 2H, -B-C(CHCH) 2C-), 7.18 (d, J= 7.4Hz, 2H, -B-C(CHCH) 2C-), 3.65 (dd, J= 7.2, 6.9Hz, 1H, D2 N-CH-COND-), 3.45 (dt, J= 11.5, 5.9Hz, 1H, and -COND-CH $_2$ -), 3.37 (dt, J= 11.5, 5.9Hz, 1H, and -COND-CH $_2$ -), 3.15 (t, J= 5.9Hz, 2H, and -CH $_2$ -OD), 2.93 (dd, J= 13.8, 6.9Hz, 1H, and -BC $_6\text{H}_4$ -CH $_2$ -), 2.87 (dd, J= 13.8, 7.2Hz, 1H, and -BC $_6\text{H}_4$ -CH $_2$ -).

^{13}C -NMR(D_2O): δ — 175.4, 138.5, 133.5, 128.7, 59.7, 55.9, and 41. — 0 and 40.0

元素分析 (C₁₁H₁₇O₄N₂ · 10 B (H₂O) - 0.29)

| | C% | H% | N% |
|-----|-------|------|-------|
| 計算値 | 54.84 | 6.47 | 10.66 |
| 測定値 | 54.83 | 6.63 | 10.65 |

[0021] The synthetic example 1 (composition of the 2-amino -1 and a 3-bis(1, 3-dibenzyl-2-GURISEROKISHI) propane (6))

10.267g (17.09mmol) 1 and 3-bis(1, 3-dibenzyl-2-GURISEROKISHI)-2-propanol and 4.896g (25.68mmol) p-tosyl chloride — pyridine 6.5ml — it mixed in inside and this mixed liquor was stirred for 17 hours at the bottom room temperature of existence of a 0.428g (3.50mmol) dimethylamino pyridine. Three 40ml N-HCl solutions were added at 0 degree C after reaction termination, and the ether extracted 3 times. The extracted organic phase was doubled, a saturation sodium-hydrogencarbonate water solution and salt water washed, and vacuum concentration was carried out after desiccation by MgSO₄. Thus, 120 degrees C was stirred in a sodium azide (3.379g, 51.98mmol) and DMF (20ml) for 5 hours, without refining the obtained tosylation object. After cooling reaction mixed liquor to a room temperature, water was added, the reaction was stopped, and the ether extracted 3 times. The extracted organic phase was doubled, a saturation sodium-hydrogencarbonate water solution and salt water washed, by MgSO₄, after desiccation, vacuum concentration was carried out and the azide was obtained. Next, the ether (20ml) solution of a lithium aluminum hydride (1.00g, 26.35mmol) was dropped at 50ml ether solution of the obtained azide at 0 degree C, and this mixture was stirred at 0 degree C for 3 hours. Ethyl acetate/water was added for the reaction, and a stop and obtained suspension were ****(ed). Vacuum concentration of the filtrate was carried out after desiccation by MgSO₄. The silica gel column chromatography using ethyl acetate/ethanol (100/1) as a developing solution refined residue, and the specified substance was obtained as colorless oily matter (7.457g, 12.43mmol, 73% of yield). Below, the data of IR, 1 H-NMR, 13 C-NMR, and ultimate analysis are shown.

[0022] IR: 3380, 3030, 2860, 2360, 1910, 1870, 1810, 1585, 1495, 1455, 1410, 1365, 1310, 1250, 1205, 1100, 735, 700 or 610cm⁻¹ 1H-NMR (neat) (CDCl₃): delta 7.21- 7.35 (m, 20H, aromatic series) and 4.50 (s, and 8H and C₆H₄CH₂O-) — 3.14 (H[tt, J= 6.7, 4.9Hz, 1H and] 2 N-CH-) 3.43-3.74 (m, 14H, and C₆H₄CH₂OCH₂- and C₆H₄CH₂OCH₂CH-), 1.90 (brs, 2H, and H₂N-)

13C-NMR(CDCl₃): delta 138.1 (aromatic series), 128.3 (aromatic series), 127.7 (aromatic series), 127.5 (aromatic series), 78.4 (-HC-O-), 73.2 (benzyl), 72.6 (methylene group), 51.3 (H₂N-C-)

元素分析 (C₁₁H₁₅O₄N)

| | C% | H% | N% |
|-----|-------|------|------|
| 計算値 | 74.10 | 7.56 | 2.34 |
| 測定値 | 74.18 | 7.38 | 2.34 |

[0023] The mixture of the compound (2.852g, 8.31mmol) of 3N-methyldiethanolamine (2.1ml, 18.29mmol) of examples and a formula (2) was stirred for 10 minutes at the room temperature among the DMF solution (10ml). In this mixture, the compound (5.460g, 9.10mmol), the 1-hydroxy benzotriazol (1.913g, 12.49mmol), and EDC (1.995g, 10.40mmol) which were obtained in the synthetic example 1 were added, and it stirred at the room temperature for 20 hours. Mixture was discharged in 3 N-HCl (100ml) solution after reaction termination, and ethyl acetate extracted the product 3 times. After salt water washed the doubled organic phase, it dried by MgSO₄ and vacuum concentration of the solvent was carried out. The short silica gel column chromatography which used chloroform/methanol (30/1) as a developing solution refined the obtained rough product, and the specified substance (7) was obtained.

[0024] It stirred at the room temperature under the hydrogen ambient atmosphere for 37 hours under existence of Pd(OH)₂-C (2.50g) which made the solution which dissolved the compound (7) obtained in the example 4 example 3 into ethanol 40ml and a HCl water solution (12 Ns, 2ml) suspend. after reaction termination and a law — the specified substance was obtained by the method. The obtained rough product was refined by HPLC ("Shim-pack" (a trade name, Shimadzu make), PREP-ODS, 20.0mmx25cm, 5ml/min., a methanol/water = it develops by one ninth), and specified substance (5) 1.321g (3.068mmol) was obtained as a white solid-state. Yield was 37%.

[0025] As for the obtained compound, it was checked by IR, 1 H-NMR, 13 C-NMR, and elemental analysis that it is the structure of a formula (5). Below, the data of IR, 1 H-NMR, 13 C-NMR, and ultimate analysis are shown.

[0026] IR(KBr): 3360, 2875, 2360, 1655, 1560, 1480, 1435, 1350, 1110, 1075 and 820, 665cm⁻¹ 1H-NMR

(D₂O):delta 7.65 (d, J= 7.4Hz, 2H, -B-C(CHCH) 2C-), 7.20 (d, J= 7.4Hz, 2H, -B-C(CHCH) 2C-), 3.95 (ND-CH[m, 1H, and]-) 3.73-3.69 (m, 15H, D₂ N-CH-COND-, -CH₂-O-x1, -CH₂-O-x5, -CH-O-x3), 3.11 (dd, J= 10.1, 5.9Hz, 1H, and -CH₂-O-), 2.90 (d, J= 13.2, 5.6Hz, 1H, and -BC₆H₄-CH₂-), 2.82 (d, J= 13.2, 9.0Hz, 1H, and -BC₆H₄-CH₂-)

¹³C-NMR(CDCl₃):delta — 175.6, 138.8, 133.7, 128.8, 127.0, 80.9, 68.6, 67.8, 60.5, 60.4, 60.2, 56.0, and 49. — 0
元素分析 (C₁₃H₁₁O₅N₂ · 10 B (H₂O) - 1.00)

| | C% | H% | N% |
|-----|-------|------|------|
| 計算値 | 52.55 | 7.10 | 6.81 |
| 測定値 | 52.85 | 6.93 | 6.82 |

and 40.1

[0027] obtaining — having had — a compound — (— one —) (BPA (OH)) — and — (— five —) — (— BPA — (— OH —) — four —) — a room temperature — it can set — water solubility — cytotoxicity (survival rate of a cell) — a cell — incorporation — BPA — Japanese Patent Application No. — five — 221048 — having proposed — BPA — (— OH —) — two — having compared .

[0028] Ten daily doses of a water-soluble boron compound were added to pure water, mixture was stirred at 20 degrees C for 12 hours, and the saturated solution of each boron compound was obtained. The insoluble boron compound was ****(ed) with the membrane filter, and asked for the concentration of the boron atom of each saturated solution using ICP-AES. Each trial was repeated 3 times and performed. A value is shown as an average of **S.E. A result is shown in Table 1.

[0029]

[Table 1]

| BPA誘導体 | 水溶性値 (M、室温) |
|-----------------------|------------------------------|
| BPA | $7.7 \pm 0.1 \times 10^{-9}$ |
| BPA (OH) | $6.0 \pm 0.1 \times 10^{-1}$ |
| BPA (OH) ₂ | $6.6 \pm 0.1 \times 10^{-1}$ |
| BPA (OH) ₄ | 1.2 ± 0.05 |

[0030] Cytotoxicity (survival rate of a cell)

The cytotoxicity over the B-16 melanoma cell (B-16) of each BPA derivative and a TIG-1-20Fibroblast cell (a Homo sapiens embryo lung normal cell, TIG) is shown in Table 2. Eagle-MEM (10% *****) was used for cell culture liquid, and each boron compound (70micromol) was dissolved in 7ml culture medium, obtained mixture was ****(ed) through the membrane filter, and it sterilized. Filtrate (3ml) and the suspension culture liquid (1x10⁵ cells / ml, 1ml) of a cell were added into the Falcon3002 culture plate (diameter of 60mm), and it diluted with this medium so that the concentration of a boron compound might be set to 1.5x10⁻²M. Suspension was cultivated for three days at 37 degrees C under 5% carbon-dioxide ambient atmosphere. The supernatant of suspension was removed, the cell which remains was processed by the trypsin, and the number of survival cells was measured. The observed value was *(ed) by the number of the standard systems which did not add a boron compound. This actuation was repeated 3 times. A value is shown as an average of **S.E. A result is shown in Table 2.

[0031]

[Table 2]

| BPA誘導体 | 残 存 率 (%) | |
|------------|-----------|-------|
| | B-16 | TIG |
| な し | 100±3 | 100±3 |
| BPA | 20±1 | 20±1 |
| BPA (OH) | 60±2 | 66±2 |
| BPA (OH) , | 60±2 | 71±2 |
| BPA (OH) , | 62±2 | 73±2 |

[0032] Cell incorporation nature, next the permeability to the cell of each boron compound were performed using the ICP-AES method. B-16 cell was cultivated by 3025 dishes (diameter of 150mm) of Falcon(s), and the number of cells when a cell grows up to be a saturation state 80% was counted (5.0×10^6 cell / pan). One dish was used for the control test (boron compound free-lancer). 2mM ** of each BPA derivative was added to these pans, and 3 and a 12 or 24-hour cell were cultivated under 37 degrees C and 5% carbon-dioxide existence. It is the residual cell after removing the supernatant of suspension 3 times calcium-Mg-Free phosphoric acid buffer solution [PBS (-)] washed, and it gathered up with the gummous policeman, dissolved by 7ml of 60% HClO_4 water solution / 30% H_2O_2 solutions, and decomposed at 70 degrees C for 1 hour. After ****(ing) with a membrane filter (Millipore (Millipore), 0.22 micrometers), boron concentration was decided by ICP-AES (the Shimadzu make, ICP-1000-III). The boron concentration of a control test was deducted from the boron concentration of the cell of each pan. The procedure with the same said of the case of TIG-1 -20 cell was used. A value is repeatedly shown for each trial as an average of **S.E. 3 times. In addition, since the solubility was low about the BPA itself, concentration was adjusted to 2mM(s) using BPA-HCl. A result is shown in drawing 1.

[0033] Boron incorporation nature is increasing with the passage of time regardless of the class of a cell and boron derivative so that drawing 1 may show. Cell incorporation of BPA(OH) n by the B-16 melanoma cell is larger than a TIG normal cell also in which time amount. It is thought that this observation is reflecting the fact that B-16 is a cancer cell and TIG is a kind of a normal cell and that growth of B-16 is quicker than TIG.

[0034] The cell incorporation in 24 hours is shown in drawing 2. With the water-soluble increment in BPA (OH) n, boron incorporation nature is concerned with B-16 melanoma and TIG-embryo pneumocyte, and is decreasing that there is nothing. It is observed from drawing 2 that there is selectivity of cell incorporation nature, and, as for the boron incorporation ratio to the TIG cell of B-16 cell, the way in BPA (OH)₄ is large rather than the case of BPA clearly.

[0035] Drawing 3 shows the water solubility of BPA(OH) n, and the relation between the boron incorporation ratios to the TIG cell of B-16 cell. This is an effective result from the selection incorporation by the cancer cell being strengthened with a water-soluble increment.

[0036] Direct contrast of a cell incorporation (intracellular mol concentration of BPA(OH) n) and a cell survival rate in 24 hours is shown in drawing 4 (as opposed to B-16), and drawing 5 (as opposed to TIG). It is thought that a correlation is between the increment in the hydrophilic property of a compound and a cytotoxic fall since cell incorporation is decreasing based on the increment in a hydrophilic property.

[0037]

[Effect of the Invention] As explained above, since the new BPA derivative expressed with the formula (1) of this invention and (5) shows a water-soluble value far higher than BPA and has high selectivity to a cancer cell, it is a compound useful to neutron capture therapy.

[Translation done.]